

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-248578

(43)Date of publication of application : 22.09.1998

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C07H 21/04
C12N 1/21
//(C12N 15/09
C12R 1:01)
(C12N 1/21
C12R 1:01)

(21)Application number : 09-065618

(71)Applicant : NITTO CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 05.03.1997

(72)Inventor : MIZUMURA YURIE
TO FUJIO

(54) EXPRESSION VECTOR FOR BACTERIUM OF GENUS RHODOCOCCUS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a general-purpose expression vector for a bacterium of the genus Rhodococcus, containing a mutant type regulatory factor having actions on constituent activation of a nitrilase gene promoter and capable of highly expressing the objective gene.

SOLUTION: This expression vector for a bacterium of the genus Rhodococcus comprises a DNA region capable of coding a regulatory factor having actions on the activation of a nitrilase gene promoter, a nitrilase promoter gene DNA region undergoing the activation by the regulatory factor, a DNA region capable of proliferating in the bacterium of the genus Rhodococcus and a drug-resistant DNA region capable of functioning in the bacterium of the genus Rhodococcus. An exogenote is integrated into the expression vector for the bacterium of the genus Rhodococcus and made to coexist in the bacterial cell of the genus Rhodococcus to thereby enable the constituent expression of the exogenote.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 01.03.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

(51)Int.Cl.⁶
 C 12 N 15/09
 C 07 H 21/04
 C 12 N 1/21
 // (C 12 N 15/09
 C 12 R 1:01)

識別記号
 ZNA

F I
 C 12 N 15/00
 C 07 H 21/04
 C 12 N 1/21

ZNAA
 B

審査請求 未請求 請求項の数 7 FD (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9-65618

(71)出願人 000003953

(22)出願日 平成9年(1997)3月5日

日東化学工業株式会社
 東京都千代田区丸の内1丁目5番1号

(72)発明者 水村 由利江
 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日
 東化学工業株式会社中央研究所内

(72)発明者 湯 不二夫
 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日
 東化学工業株式会社中央研究所内

(54)【発明の名称】 ロドコッカス属細菌用発現ベクター

(57)【要約】

【解決手段】 ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化する作用をもつ調節因子をコードするDNA領域、該調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーターDNA領域、ロドコッカス属細菌細胞内で増殖可能なDNA領域およびロドコッカス属細菌において機能する薬剤耐性DNA領域を含んでなるロドコッカス属細菌用発現ベクター。

【効果】 ロドコッカス属細菌用発現ベクターに外来遺伝子を組み込みロドコッカス属菌体内に共存させることにより、構成的に外来遺伝子の発現を可能にせしめる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記(1)～(4)のDNA領域を含んでなるロドコッカス(*Rhodococcus*)属細菌用発現ベクター。

(1) ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化する作用をもつ調節因子をコードするDNA領域

(2) (1)の調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーターDNA領域

(3) ロドコッカス属細菌細胞内で増殖可能なDNA領域

(4) ロドコッカス属細菌において機能する薬剤耐性DNA領域

【請求項2】 調節因子が配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドの2成分より構成される請求項1記載の発現ベクター。

【請求項3】 ポリペプチドをコードする遺伝子が配列番号3および配列番号4の塩基配列を有する請求項2記載の発現ベクター。

【請求項4】 ロドコッカス属細菌細胞内で複製増殖可能なDNA領域がプラスミドpRC001、pRC002、pRC003およびpRC004からなる群から選ばれる少なくとも1種のプラスミド由来である請求項1記載の発現ベクター。

【請求項5】 薬剤耐性DNA領域がトランスポゾンTN903由来のカナマイシン耐性遺伝子からなる請求項1記載の発現ベクター。

【請求項6】 請求項1～5に記載の発現ベクターにニトリルヒドラーゼ遺伝子を組み込んだ組換え体プラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換え体プラスミドにより形質転換されたロドコッカス属に属する微生物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は構成的に外来遺伝子の発現を可能とするロドコッカス(*Rhodococcus*)属細菌用発現ベクターに関する。詳しくは、ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化する作用をもつ調節因子をコードするDNA領域、調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーターDNA領域、ロドコッカス属細菌内で複製可能なDNA領域および薬剤耐性遺伝子を含むDNA領域を含有する発現ベクター、ならびにこの発現ベクターにニトリルヒドラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドにより形質転換されたロドコッカス属に属する微生物に関する。

【0002】

【従来の技術】 ロドコッカス属に属する微生物は、その物理的強度や酵素等を細胞内に多量蓄積する能力から、産業的に有用な微生物触媒として知られ、例えば、ニトリル類の酵素的水和または加水分解によるアミドまたは酸の生産等に利用されている(特開平2-470、特開平3-251192参照)。また、これらの酵素を含む微生物触媒

を、遺伝子組換えの方法によりさらに有用なものに改良する試みがなされている(特開平4-211379、特開平6-25296、特開平6-303971参照)。さらに、ロドコッカス属に属する微生物の遺伝子操作を効率的に押し進めるために、宿主一ベクター系の開発が進められており、新規なプラスミドの探索(特開平4-148685、特開平4-330287、特開平7-255484、特開平 参照)やベクターの開発(特開平5-64589、特開平8-56669、Journal of Bacteriology 170, 638-645 (1988)、米国特許4,920,054)などが行われている。

【0003】 本発明者らは、すでにロドコッカスエリスロポリス(*Rhodococcus erythropolis*)SK92株からニトリラーゼ遺伝子およびその調節遺伝子をクローン化し、複合プラスミドベクターpK4を用いてロドコッカス属体内での発現を可能とした(特開平8-173169参照)。さらに、ニトリラーゼ発現の構成化した変異株SK92-B1株の構成化に関わる変異調節因子をコードする遺伝子を誘導型ニトリラーゼ産生細菌内に導入することにより、誘導物質を添加することなくニトリラーゼを得ることを可能にした(特開平9-23832号公報参照)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、これまでロドコッカス属の汎用的な発現ベクターは知られておらず、遺伝子を高発現させるための新しいベクターの開発が望まれていた。

【0005】

【課題を解決するための手段】かかる状況下、鋭意検討を行った結果、本発明者らは、ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを構成的に活性化する作用を有する変異型調節因子を含む汎用的で且つ目的とする遺伝子を高発現させ得るロドコッカス細菌用発現ベクターを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】

1) 下記(1)～(4)のDNA領域を含んでなるロドコッカス(*Rhodococcus*)属細菌用発現ベクター、

(1) ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化する作用をもつ調節因子をコードするDNA領域

(2) (1)の調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーターDNA領域

(3) ロドコッカス属細菌細胞内で増殖可能なDNA領域

(4) ロドコッカス属細菌において機能する薬剤耐性DNA領域

2) 上記発現ベクターにニトリルヒドラーゼ遺伝子を組み込んだ組換え体プラスミド、ならびに、

3) 上記組換え体プラスミドにより形質転換されたロドコッカス属に属する微生物、に関する。

【0007】

【発明の実施の形態】 以下に、本発明を詳細に説明する。なお、本発明の調節因子はロドコッカスエリスロポ

リス (*Rhodococcus erythropolis*) SK92株の変異株SK92-B1株由来のものであるが、SK92株由來の調節因子を用いることにより、誘導型の発現ベクターにすることができる。

【0008】SK92-B1株は *R. erythropolis* SK92-B1 (FERM P-14853)、SK92株は *Rhodococcus* sp. SK92 (FERM BP-3324)として、それぞれ工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。その他、以下に説明するプラスミド等は以下のとおりである。すなわち、SK92株由來ニトリラーゼ遺伝子および調節遺伝子を含むプラスミドpSK106はこれを含有する形質転換体 *E. coli* JM109/pSK106 (FERM P-14856)、SK92-B1株由來ニトリラーゼ遺伝子および調節遺伝子を含むプラスミドpBSK201はこれを含有する形質転換体 *E. coli* JM109/pBSK201 (FERM P-14855)、複合プラスミドベクターpK4はこれを含有する形質転換体 *R. rhodochrous* ATCC 12674/pK4 (FERM BP-3731)、ロドコッカス ロドクロウス J-1株のH型ニトリルヒドラーゼ遺伝子を含むプラスミドpNHJ10Hはこれを含有する形質転換体 TG1/pNHJ10H (FERM BP-2777)、プラスミドpSJ023は形質転換体 *R. rhodochrous* ATCC12674/pSJ023 (FERM P-16108)として、同じく工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0009】

【実施例】以下、実施例により詳細に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0010】実施例1

1) 調節遺伝子をコードする遺伝子を含むプラスミドの作製

1-1) DNA断片の作製

SK92株由來のプラスミドpSK106の調節遺伝子をコードする遺伝子を含む領域 (約3 kb EcoRV断片) (特開平8-173169参照) を、SK92-B1株由來のプラスミドpBSK201の調節遺伝子をコードする遺伝子を含む領域 (約3 kb EcoRV断片) とを置き換えたプラスミドpBSK302 (特開平9-23832参照) を制限酵素SacIで切断後、7.3 kbのSacI断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。10 μlのpBSK302に対し、10倍濃度制限酵素緩衝液10 μl、滅菌水78 μl、制限酵素SacI 2 μlを加え37℃にて2時間反応させた。ベクターに用いたpUC118断片は次のように作製した。10 μlのpUC118に対し10倍濃度制限酵素緩衝液10 μl、滅菌水77 μl、制限酵素SacI 2 μlを加え37℃で2時間反応後、フェノール処理、エタノール沈殿させた後乾燥して50 μlの滅菌水に溶解した。さらに、アルカリフォスタマー

ゼ (宝酒造株式会社) 1 μl、10倍濃度緩衝液10 μl、滅菌水39 μlを加え65℃で反応後フェノール処理、エタノール沈殿を行い乾燥して滅菌水に溶解した。

7.3 kb断片を含むDNA断片画分1 μlを、上記のように調製したSacI切断pUC118とライゲーションキット (宝酒造株式会社) を用いて4℃で一晩反応させることによりpUC118への挿入を行った。

【0011】1-2) 形質転換体の作製および組換え体DNAの選別

10 大腸菌JM109株をLB培地 (1.0%バクトリpton、0.5%バクトイーストエキス、0.5%NaCl) 1 mlに接種し37℃、5時間前培養し、この培養物100 μlをSOB培地50 ml (2%バクトリpton、0.5%バクトイーストエキス、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、1 mM MgSO₄、1 mM MgCl₂) に加え、18℃で20時間培養した。遠心により集菌した後、冷13 ml TF溶液 (20 mM PIPES-KOH (pH 6.0)、200 mM KCl、10 mM CaCl₂、40 mM MnCl₂) を13 ml加え、0℃で10分放置後、再度遠心した。上澄を除いた後、沈殿した大腸菌に冷TF溶液3.2 mlに懸濁し0.22 mlのジメチルスルホキシドを加え0℃で10分間放置した。こうして作製したコンピテントセル200 μlに工程1-1) で作製した組換え体プラスミドを含有する溶液 (DNAライブラリー) を10 μl加え、0℃で30分放置後、42℃で30秒間ヒートショックを与え0℃で2分間冷却後、SOC培地 (SOB培地に20 mMグルコースを加えたもの) を0.8 ml加え37℃にて60分間振盪培養した。これを200 μlずつアンピシリン30 100 μg/mlと1 mMのIPTG (イソプロピル-β-チオガラクトシド) と0.3 mMのX-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトビラノシド) 含有のLB寒天培地にまき、37℃で培養した。寒天培地上に生育した形質転換体コロニーについて青色発色の有無により目的の組換え体の選択を行った。

【0012】1-3) 組換え体プラスミドの調製

工程1-2) で選択した形質転換体を100 mlのLB培地にて37℃で一晩培養し、集菌後、滅菌水により洗浄し、溶液I (2 mMグルコース、10 mM EDTA、2.5 mM Tris-HCl (pH 8.0) を5 ml、リゾチームを25 mg加え、0℃で30分間放置した。溶液II (1 N NaOH、5% SDS) を10 ml加え0℃で5分間放置し、溶液III (3 M酢酸ナトリウム (pH 4.8) を7.5 ml加え0℃で30分間放置した。これを遠心し、その上澄みに50 mlのエタノールを加えさらに遠心し上清を取り除き5 mlの溶液IV (10 mM酢酸ナトリウム、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) とリボヌクレアーゼA溶液 (10 mg/ml) を2.5 μl加え室温で20分間放置した。これに12 mlのエタノール

5
を加え遠心後沈殿したプラスミドを乾燥し滅菌水で溶解した。こうして得られたプラスミドをpBSK305と命名した。

【0013】2) ニトリラーゼ遺伝子プロモーター下流へニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む領域が導入された、ロドコッカス属において複製可能な組換え体プラスミドの作製

工程1) で作製したプラスミドpBSK305のニトリラーゼ遺伝子プロモーター下流にニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む領域を導入し、さらに、ベクターをpK4(FERM BP-3731:ロドコッカス属プラスミドpRC004と大腸菌ベクターpHSG299(トランスポゾンTN903由来のカナマイシン耐性遺伝子を含む)を連結させたもの(特開平5-64589、特開平5-68566参照)]としたプラスミドを作製した。プラスミドpBSK305を制限酵素XbaIとEcoRIで切断後、7.3kbの断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。10μlのpBSK305に対し、10倍濃度制限酵素緩衝液10μl、滅菌水76μl、制限酵素XbaIとEcoRIをそれぞれ2μl加え37℃にて2時間反応させた。

【0014】ベクターに用いたpK4断片は次のように作製した。10μlのpK4に対し10倍濃度制限酵素緩衝液10μl、滅菌水78μl、制限酵素EcoRI2μlを加え37℃で2時間反応後、フェノール処理、エタノール沈殿させた後乾燥して50μlの滅菌水に溶解した。さらに、アルカリフィオスタファーゼ(宝酒造株式会社)1μl、10倍濃度緩衝液10μl、滅菌水39μlを加え65℃で反応後フェノール処理、エタノール沈殿を行い乾燥して滅菌水に溶解した。

【0015】J-1株H型ニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む6.0kbDNA断片がpUC19ベクターに組み込まれたプラスミドpNHJ10H[特開平4-211379、Biochim. Biophys. Acta 1129, 23-33(1991)参照]を制限酵素BamHIで、切断後セルフライゲーションしてプラスミドpFY702を作製した。これを制限酵素EcoRVで切断後、リンカー-pXbaI(宝酒造株式会社)とライゲーションし、さらに制限酵素EcoRIで切断後ニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む2.1kbの断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。7.3kb断片1μlと、ニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む2.1kb断片1μlおよび、上記のXbaIとEcoRI切断pK41μlとをライゲーションキット(宝酒造株式会社)を用いて4℃で一晩反応させることによりプラスミドpSJ02を作製した(図1)。

【0016】3) ロドコッカス属細菌の形質転換および形質転換体のニトリルヒドラターゼ活性

ロドコッカス ロドクロウス ATCC12674株の対数増殖期の細胞を遠心分離により集菌し、氷冷した滅

菌水にて3回洗浄し、滅菌水に懸濁した。1μlのプラスミドpSJ002と菌体懸濁液10μlを混合し、氷冷した。チャンバーにDNAと菌体の混合液を入れ、遺伝子導入装置CET-200型(日本分光)により電場強度3.8kV/cm、パルス幅1ms、パルス回数20回で電気パルス処理を行った。電気パルス処理液を氷冷下10分間静置し、37℃で、10分間ヒートショックを行い、MYK培地(0.5%ポリベプトン、0.3%バクトモルトエキス、0.3%バクトイーストエキス、0.2%KH₂PO₄、0.2%K₂HPO₄(pH7.0))500μlを加え、26℃、3時間振盪培養した後、75μg/mlカナマイシン入りMYK寒天培地に塗布し26℃、3日間培養した。

【0017】こうして作製したロドコッカス属細菌組換え体(ATCC12674/pSJ002)をMYK培地(50μg/mlカナマイシン含有)10mlに接種し、30℃で24時間前培養した。この培養物1mlを培地100ml(1.5%グルコース、0.1%バクトイーストエキス、1%グルタミン酸ナトリウム、0.05%KH₂PO₄、0.05%K₂HPO₄、0.05%硫酸マグネシウム、0.01%塩化コバルト、pH7.2、50μg/mlカナマイシン含有)に加え、30℃で60時間培養した。集菌後、この菌体を50mMリン酸緩衝液(pH7.7)に懸濁し、その一部を2.5%アクリロニトリルを含有する同緩衝液中で10℃、10分反応させた。1N塩酸の添加により反応を止め、反応液中の生成アクリルアミドを高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。その結果、ロドコッカス属細菌組換え体ATCC12674/pSJ002において、44mMのアクリルアミドの生成が認められた。

【0018】4) プラスミドpSJ023の作製
pSJ002には、遺伝子発現に必要ない領域がまだ多く残っているため、不要な領域を取り除いたプラスミドpSJ023を作製した。pSJ002を制限酵素EcoRIで部分分解後、さらにEcoRVで切断し末端平滑化処理をおこなった後、リンカー-pEcoRI(宝酒造株式会社)とともにライゲーションを行い、プラスミドpSJ008を作製した。10μlのpSJ002に対し、10倍濃度制限酵素緩衝液10μl、滅菌水7.5μl、制限酵素EcoRI 10.5μlを加え37℃にて1時間反応させ、エタノール沈殿させた後乾燥して10μlの滅菌水に溶解した。さらにKlenow Fragment(宝酒造株式会社)2μl、10倍濃度緩衝液10μl、滅菌水78μlを加え37℃で反応後フェノール処理、エタノール沈殿を行い乾燥して滅菌水10μlに溶解した。14.6kbのDNA断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。回収したDNA断片10μlに対し10倍濃度制限酵素緩衝液10μl、滅菌水78μl、制限酵素EcoRV 2μlを加え、2時間反応させ、フェノール処理、

エタノール沈殿を行った。次に、ライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて、リンカー p E c o R I（宝酒造株式会社）と 4 ℃で一晩反応させた。この溶液で形質転換された大腸菌よりプラスミド p S J 0 0 8 を得た。

【0019】また、プラスミド p B S K 3 0 2 から調節遺伝子をコードする遺伝子を含む領域、約 3 k b E c o R V 断片を、0.7% アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。制限酵素による切断は、10 μl の p B S K 3 0 2 に対し、10 倍濃度制限酵素緩衝液 10 μl、滅菌水 78 μl、制限酵素 E c o R V 2 μl を加え 37 ℃にて 2 時間反応させることにより行った。この 3 k b E c o R V 断片 1 μl を、E c o R I で切断した p U C 1 1 8 とライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて 4 ℃で一晩反応させることにより p U C 1 1 8 への挿入を行い、p B S K 2 0 2 を作製した。プラスミド p B S K 2 0 2 を制限酵素 E c o R I で切断後、3 k b 断片を 0.7% アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。

【0020】次に、プラスミド p S J 0 0 8 を制限酵素 E c o R I で部分分解後、さらにアルカリフィオスタファーゼ（宝酒造株式会社）で B A P 処理を行い、8.72 k b 断片を 0.7% アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。これと p B S K 2 0 2 由来の 3 k b E c o R I 断片とをライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて 4 ℃で一晩反応させることにより、プラスミド p S J 0 2 3 を作製した（図2）。

【0021】5) プラスミド p S J 0 2 3 を含むロドコッカス属細菌形質転換体のニトリルヒドラターゼ活性工程 3) と同様にして、プラスミド p S J 0 2 3 のロドコッカス ロドクロウス ATCC 1 2 6 7 4 への導入を行い組み換え体（ATCC 1 2 6 7 4 / p S J 0 2 3）を作製した。こうして作製したロドコッカス属細菌組換え体を M Y K 培地（50 μg/ml カナマイシン含有）10 ml に接種し、30 ℃で 24 時間前培養した。この培養物 1 ml を培地 100 ml（1.5% グルコース、0.1% バクトイーストエキス、1% グルタミン酸ナトリウム、0.05% K H 2 P O 4 、0.05% K 2 H P O 4 、0.05% 硫酸マグネシウム、0.01% 塩化コバルト、pH 7.2、50 μg/ml カナマイシン含有）に加え、30 ℃で 60 時間培養した。集菌後、この菌体を 5

配列：

MetAlaGlyAlaAspValHisAlaGlnGlyGlyThrAsnArgArg	15
AlaArgIleLeuValValAspAspGluLysHisValArgThrMet	30
ValThrTrpGlnLeuGluSerGluAsnPheAspValValAlaAla	45
AlaAspGlyAspAlaAlaLeuArgGlnValThrGluSerAlaPro	60
AspLeuMetValLeuAspLeuSerLeuProGlyLysGlyGlyLeu	75
GluValLeuAlaThrValArgArgThrAspAlaLeuProLeuVal	90
ValLeuThrAlaArgArgAspGluThrGluArgIleValAlaLeu	105
AspLeuGlyAlaAspAspTyrValIleLysProPheSerProArg	120

0 mM リン酸緩衝液（pH 7.7）に懸濁し、その一部を 2.5% アクリロニトリルを含有する同緩衝液中で 10 ℃、10 分反応させた。1 N 塩酸の添加により反応を止め、反応液中の生成アクリルアミドを高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したところ 40 mM のアクリルアミドの生成が認められた。

【0022】6) ロドコッカス属細菌用発現ベクターの作製

工程 4) で作製したプラスミド p S J 0 2 3 からニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む領域を取り除くことにより汎用的な発現ベクターを作製した。10 μl の p S J 0 2 3 に対し、10 倍濃度制限酵素緩衝液 10 μl、滅菌水 78 μl、制限酵素 Xba I 2 μl を加え 37 ℃にて 2 時間反応させた。その後ライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて 4 ℃で一晩反応させた。次に、工程 1-2) 同様大腸菌 J M 1 0 9 のコンビテントセルを作製し、この反応液を 10 μl 加え、0 ℃で 30 分放置した。その後、42 ℃で 30 秒間ヒートショックを与え 0 ℃で 2 分間冷却後、S O C 培地を 0.8 ml 加え 37 ℃にて 60 分間振盪培養した。これを 200 μl ずつカナマイシン 100 μg/ml 含有の L B 寒天培地にまき、37 ℃で培養した。寒天培地上に生育した形質転換体コロニーについて工程 1-3) 同様プラスミドの調製を行った。こうして得られたプラスミドを p R Y 0 1 と命名し、ロドコッカス属発現ベクターとした。

【0023】

【発明の効果】ロドコッカス属細菌用発現ベクターに外来遺伝子を組み込みロドコッカス属菌体内に共存させることにより、構成的に外来遺伝子の発現を可能にせしめる。

【0024】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：244

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ロドコッカス エリスロポリス（Rhodococcus erythropolis）

株名：SK 9 2 - B 1

9

GluLeuAlaAlaArgIleArgAlaValLeuArgArgThrThrAla	135
GluProProHisGluAlaAlaValGlnArgPheGlyAspLeuGlu	150
IleAspThrAlaAlaArgGluValArgLeuHisGlyIleProLeu	165
GluPheThrThrLysGluPheAspLeuLeuAlaTyrMetAlaAla	180
SerProMetGlnValPheSerArgArgGlyLeuLeuGluVal	195
TrpArgSerSerProAspTrpGlnGlnAspAlaThrValThrGlu	210
HisValHisArgIleArgArgLysIleGluGluAspProThrLys	225
ProThrIleLeuGlnThrValArgGlyAlaGlyTyrArgPheAsp	240
GlyGluArgAla	244

【0025】配列番号：2

配列の長さ：534

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

MetMetThrAspThrLeuProSerSerSerArgTrpThrLeuGlu	15
GlyProHisLeuGlnProLeuGlnGlyGluAlaLeuAlaAspLeu	30
HisAlaArgThrLeuGluMetIleThrSerGlyArgGluLeuHis	45
GluThrLeuGluValValAlaArgGlyIleGluGluLeuMetPro	60
GlyLysArgCysAlaAlaIleLeuLeuLeuAspAsnThrGlyProVal	75
LeuArgCysGlyAlaAlaProThrMetSerAlaProTrpArgArg	90
TrpIleAspSerLeuValProGlyProMetSerGlyGlyCysGly	105
ThrAlaValHisLeuGlyGluProValIleSerTyrAspValAla	120
AspAspProLysPheArgGlyProPheArgAlaAlaAlaLeuHis	135
GluGlyIleArgAlaCysTrpSerThrProValThrSerGlyAsp	150
GlyThrIleLeuGlyThrPheAlaAlaIleTyrGlySerValProAla	165
PheProAlaGlnGlnAspValAlaLeuValThrGlnCysThrAsp	180
LeuThrAlaAlaValIleThrThrHisLysLeuHisGlnAspLeu	195
SerMetSerGluGluArgPheArgArgThrPheAspSerAsnVal	210
ValGlyMetAlaLeuLeuAspGluSerGlySerSerIleArgVal	225
AsnAspThrLeuCysAlaLeuThrAlaAlaProProArgArgLeu	240
LeuGlyHisProMetGlnGluIleLeuThrAlaAspSerArgGlu	255
ProPheAlaAsnGlnLeuSerSerIleArgGluGlyLeuThrAsp	270
GlyGlyGlnLeuAspGlyArgIleGlnThrThrGlyGlyArgTrp	285
IleProValHisLeuSerSerIleSerGlyMetTrpThrThrGluArg	300
GluPheMetGlyPheSerValHisValLeuAspIleSerGluArg	315
LeuAlaAlaGluArgAlaArgGluGluGlnLeuGluAlaGluVal	330
AlaArgHisThrAlaGluGluAlaSerArgAlaLysSerThrPhe	345
LeuSerGlyMetThrHisGluValGlnThrProMetAlaValIle	360
ValGlyPheSerGluIleLeuGluIleLeuGluAspLeuAspGluGlu	375
ArgArgGlnCysAlaTyrArgLysIleGlyGluAlaAlaLysHis	390
ValIleSerLeuValAspAspValLeuAspIleAlaLysIleGlu	405
AlaGlyAlaIleThrLeuGlnAspGluAspIleAspLeuSerGlu	420
GluValAlaThrIleValGluMetLeuGluProIleAlaArgAsp	435
ArgAspArgAspValCysLeuArgTyrValProProGlnThrPro	450
ValHisValCysSerAspArgArgValArgGluValLeuLeu	465
AsnIleValSerAsnGlyIleLysTyrAsnArgLeuGlyGlyVal	480
ValAspProProThrGlySerGlyAlaAlaArgProArgGlnThr	495
ArgAlaProAspTyrProAlaThrProThrThrAsnSerSerSer	510
ProSerThrGlyTrpGluSerArgProArgGlyCysLysGlyArg	525

10 起源

生物名：ロドコッカス エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis)

株名：SK92-B1

GlySerValLeuArgSerProAlaArg

534

【0026】配列番号：3

配列の長さ：735

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

*起源

生物名：ロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*)

株名：SK 92-B1

*

配列：

ATG	GCC	GGA	GCG	GAC	GTC	CAC	GCC	CAG	GGT	GGC	ACG	AAT	CGA	CGT	45
GCA	CGC	ATC	CTC	GTC	GTC	GAC	GAC	GAA	AAA	CAC	GTG	CGC	ACG	ATG	90
GTG	ACG	TGG	CAA	CTC	GAA	TCG	GAG	AAT	TTC	GAT	GTT	GTC	GCT	GCG	135
GCA	GAC	GGA	GAT	GCG	GCA	CTG	CGT	CAG	GTC	ACT	GAG	AGC	GCA	CCC	180
GAT	TTG	ATG	GTG	CTC	GAT	CTG	TCG	CTC	CCG	GGG	AAA	GGT	GGG	TTG	225
GAA	GTG	CTC	GCT	ACG	GTC	CGC	AGA	ACC	GAT	GCA	CTG	CCT	ATC	GTC	270
GTG	CTC	ACA	GCA	CGC	CGC	GAT	GAA	ACC	GAA	CGG	ATC	GTC	GCG	CTG	315
GAT	CTC	GTC	GCC	GAC	TAC	GTC	ATC	AAA	CCG	TTC	TCC	CCG	CGG	360	
GAA	TTG	GCC	GCC	CGT	ATC	CGG	GCA	GTG	CTT	CGT	CGA	ACC	ACA	GCT	405
GAA	CCC	CCA	CAC	GAG	GCG	GCG	GTT	CAG	CGA	TTC	GGT	GAC	CTA	GAG	450
ATC	GAC	ACC	GCT	GCG	CGC	GAG	GTT	CGG	CTC	CAC	GGG	ATA	CCG	CTC	495
GAG	TTC	ACC	ACC	AAG	GAG	TTC	GAT	CTG	CTG	GCC	TAT	ATG	GCC	GCA	540
TCA	CCG	ATG	CAG	GTC	TTC	AGC	CGA	CGC	AGA	TTG	TTG	CTC	GAG	GTG	585
TGG	CGA	TCG	TCG	CCC	GAC	TGG	CAG	CAG	GAC	GCC	ACC	GTG	ACC	GAG	630
CAC	GTG	CAC	CGC	ATT	CCG	CGC	AAG	ATC	GAA	GAA	GAT	CCC	ACC	AAA	675
CCG	ACG	ATC	CTG	CAG	ACA	GTG	CGG	GGA	GCC	GGT	TAC	CGT	TTC	GAC	720
GGG	GAG	CGT	GCA	TGA											735

【0027】配列番号：4

配列の長さ：1605

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：ロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*)

株名：SK 92-B1

配列：

ATG	ATG	ACC	GAC	ACA	CTG	CCC	TCC	TCG	TCC	CGT	TGG	ACC	CTT	GAA	45
GGC	CCG	CAT	CTC	CAG	CCG	CTG	CAG	GGT	GAG	GCG	GCC	CTG	GCG	GAT	90
CAC	GCC	CGT	ACG	CTC	GAG	ATG	ATC	ACT	TCC	GGG	AGA	GAA	TTG	CAC	135
GAG	ACA	CTC	GAG	GTG	GTC	GCC	CGC	GCG	ATC	GAG	GAA	CTG	ATG	CCG	180
GGC	AAA	CGT	TGC	GCA	ATT	CTG	TTG	CTC	GAC	AAC	ACC	GGA	CCG	GTA	225
TTG	CGC	TGC	GCG	GCG	GCC	CCA	ACA	ATG	AGC	GCG	CCG	TGG	CGC	CGG	270
TGG	ATC	GAC	AGC	CTC	GTC	CCT	GGT	CCG	ATG	TCG	GGT	GGC	TGC	GGC	315
ACA	GCG	GTT	CAC	CTC	GGC	GAG	CCG	GTT	ATT	TCC	TAT	GAC	GTG	GCC	360
GAT	GAC	CCG	AAA	TTC	CGC	GGC	CCC	TTC	CGC	GCC	GCA	GCC	CTC	CAC	405
GAG	GGC	ATA	CGT	GCC	TGC	TGG	TCC	ACC	CCC	GTC	ACA	AGC	GGA	GAC	450
GGC	ACG	ATC	CTC	GGC	ACT	TTC	GCG	ATC	TAC	GGA	TCC	GTG	CCG	GCG	495
TTC	CCC	GCA	CAA	CAG	GAC	GTT	GCC	CTG	GTC	ACC	CAA	TGC	ACC	GAC	540
CTG	ACC	GCT	GCC	GTC	ATC	ACC	ACC	CAC	AAA	CTT	CAT	CAA	GAT	CTG	585
AGC	ATG	AGC	GAG	GAG	CGG	TTC	CGA	CGC	ACC	TTC	GAT	TCC	AAT	GTC	630
GTC	GGC	ATG	GCA	CTT	CTC	GAC	GAA	TCC	GGC	TCC	AGC	ATC	CGC	GTC	675
AAC	GAC	ACC	CTG	TGC	GCG	TTG	ACC	GCA	GCT	CCG	CCA	CGG	CGC	CTC	720
CTC	GGC	CAC	CCC	ATG	CAG	GAG	ATA	CTC	ACC	GCC	GAC	TCC	CGG	GAA	765
CCG	TTC	GCC	AAT	CAG	TTG	TCC	TCC	ATC	CGT	GAG	GGA	TTG	ACC	GAC	810
GCC	GGA	CAG	CTC	GAC	GGA	CGA	ATC	CAA	ACC	ACC	GGA	GGT	CGG	TGG	855
ATT	CCG	GTG	CAC	CTG	TCC	ATC	AGC	GGT	ATG	TGG	ACC	ACG	GAG	CGG	900

13

GAG TTC ATG GGA TTC AGC GTC CAT GTC CTG GAC ATC TCC GAG CGC	945
CTG GCC GCC GAA CGC GCC CGC GAG GAA CAA CTC GAG GCC GAG GTT	990
GCC CGC CAT ACC GCG GAG GAA GCC AGT CGC GCC AAG TCC ACG TTC	1035
CTG TCC GGC ATG ACG CAC GAG GTC CAA ACG CCC ATG GCC GTT ATC	1080
GTC GGA TTC AGT GAG CTA CTC GAG ACG CTG GAC CTG GAT GAA GAA	1125
CGT CGT CAG TGC GCC TAC CGC AAG ATC GGC GAA GCC GCG AAA CAC	1170
GTG ATC TCC CTG GTC GAC GAC GTT CTC GAT ATA GCC AAG ATC GAA	1215
GCC GGC GCT ATC ACT CTG CAG GAC GAA GAC ATC GAC CTG TCC GAA	1260
GAA GTT GCC ACC ATC GTG GAG ATG CTC GAG CCC ATC GCC CGT GAC	1305
CGT GAC CGT GAC GTC TGC CTG CGG TAC GTC CCG CCG CAG ACA CCG	1350
GTG CAC GTG TGC TCG GAC CGG CGG CGG GTG CGG GAA GTG CTG CTC	1395
AAC ATC GTC TCC AAC GGG ATC AAG TAC AAT CGG CTC GGT GGT GTC	1440
GTC GAC CCC CCA ACA GGA TCA GGG GCT GCT CGT CCG CGT CAG ACG	1485
AGG GCC CCG GAC TAC CCA GCG ACG CCG ACG AAC TCT TCG AGC	1530
CCT TCA ACC GGC TGG GAG TCG AGG CCA CGG GGG TGC AAG GGT CGG	1575
GGC TCG GTC TTG CGC TCT CCC GCG CGC TGA	1605

【0028】

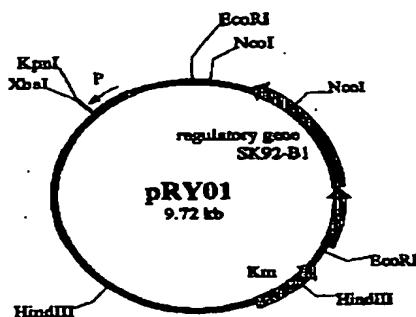
【図面の簡単な説明】

【図1】組換え体pSJ002の作製図

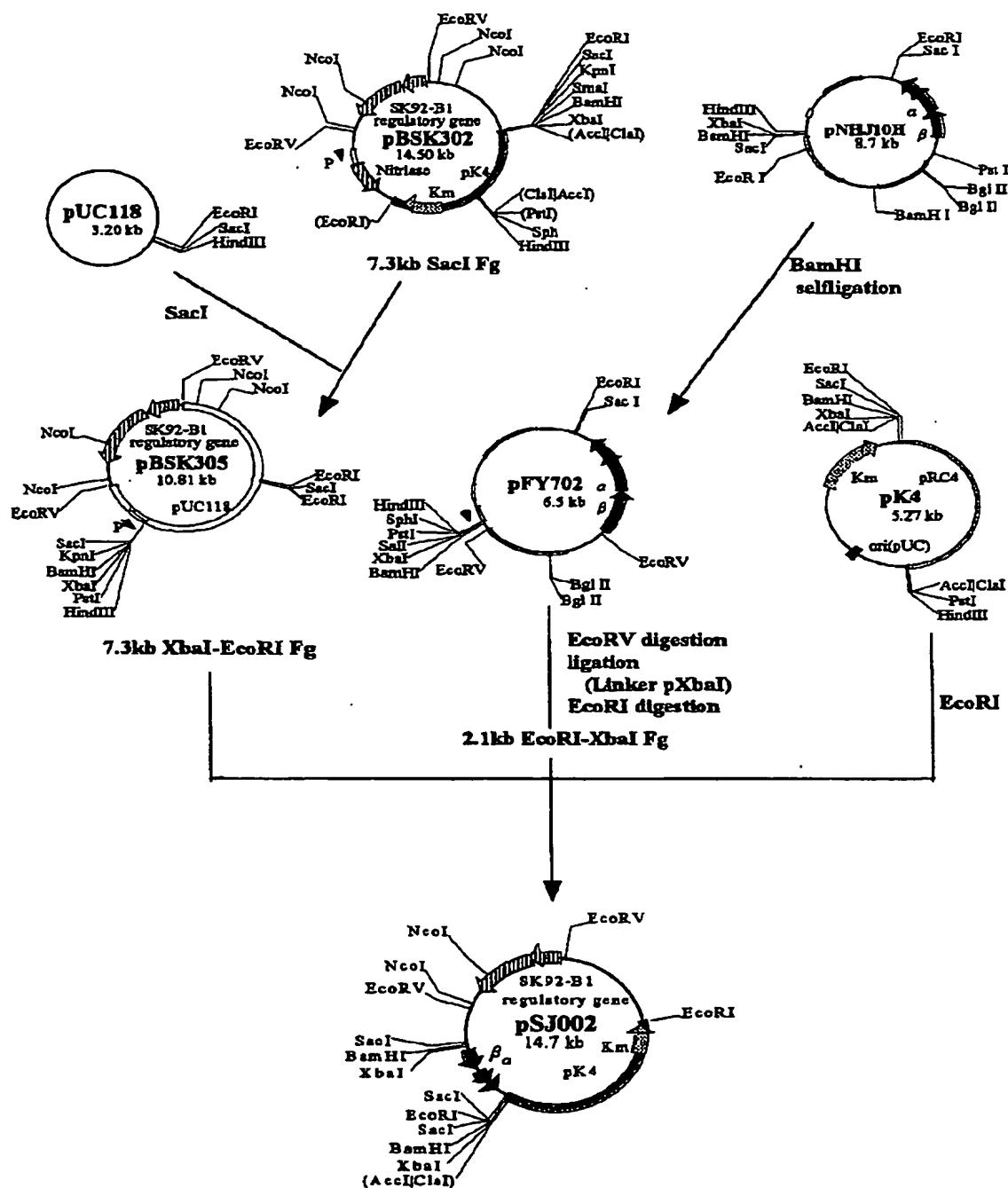
【図2】組換え体pSJ023の作製図

【図3】発現ベクターpRY01の制限酵素地図

【図3】

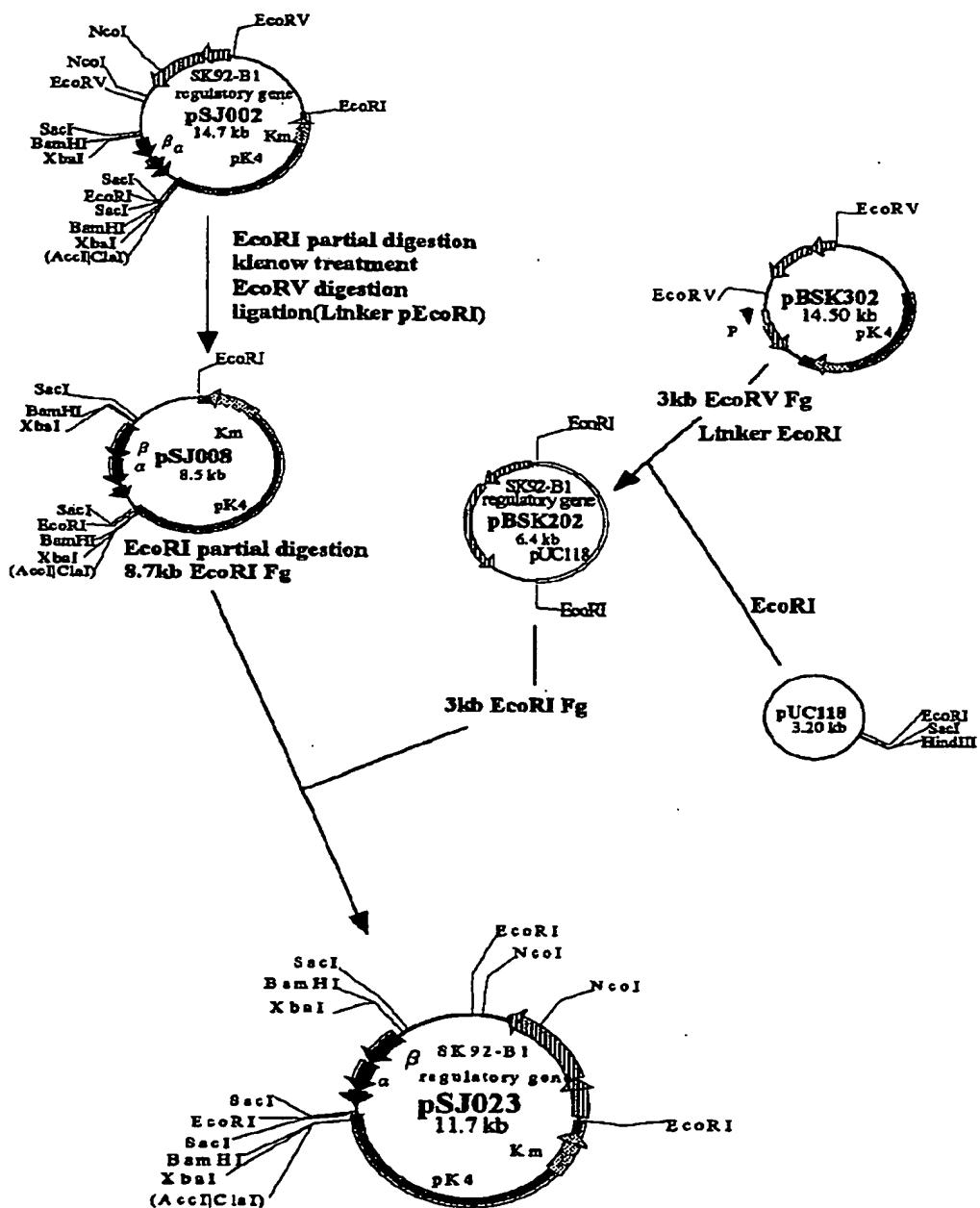


【図1】



BEST AVAILABLE COPY

【図2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. 6

識別記号

F I

(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:01)